

#5

CERTIFICATE OF VERIFICATION



Ursula Scherz

of Schlesierstr. 8  
81669 München  
Germany

state that the attached document is true and complete translation to the best of my knowledge of German Patent Application DE 196 44 500.0.

Dated this 21<sup>st</sup> day of February 2001

Signature of Translator: Ursula Scherz



Certified translation of a priority document

**FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY**

(coat of arms)

**Certification of Priority on the Filing of a Patent  
Application**

**File No.:** 196 44 500.0

**Date of Filing:** October 25, 1996

**Applicant/Patentee:** Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung  
des öffentlichen Rechts, Heidel-  
berg, Neckar/Germany; Transgene S.A.,  
Strasbourg/France.

First Applicant: Deutsches Krebsfor-  
schungszentrum Stiftung des öffentlichen  
Rechts, Heidelberg, Neckar/Germany

**Title:** AAV DNA Comprising Helper Virus  
Sequences

**IPC:** C 12 N, A 61 K, C 07 H

**The attached sheets are a true and exact reproduction of  
the original documents of this patent application.**

München, February 1, 2001  
**German Patent and Trademark Office**  
**The President**

Seal:  
German Patent and  
Trademark Office

by order  
(signature)  
Waasmaier

### AAV DNA comprising helper virus sequences

The present invention relates to AAV DNA having helper virus sequences, a system containing such a DNA and its use.

AAVs (adeno-associated viruses) are single stranded DNA viruses belonging to the Parvovirus family. For their replication, i.e. for forming viral particles, AAVs require helper viruses, particularly adenoviruses or herpesviruses. In the absence of helper viruses, AAVs may incorporate into the host cell genome, particularly at a specific site of chromosome 19.

The genome of AAVs is linear and has a length of about 4680 nucleotides. It comprises two reading frames which code for a structural gene and a non-structural gene. The structural gene is referred to as cap gene. It is controlled by the P40 promoter and codes for three capsid proteins. The non-structural gene is referred to as rep gene and codes for the Rep proteins Rep 78, Rep 68, Rep 52 and Rep 40. The two former proteins are expressed under the control of the P5 promoter, while the expression of Rep 52 and Rep 40 is controlled by the P19 promoter. The functions of the Rep proteins are represented *inter alia* by the control of replication and transcription of the AAV genome.

It has now turned out that preparations of recombinant (r)AAV viral particles are frequently contaminated with helper viruses, e.g. adenoviruses or herpesviruses. This contamination considerably limits the use of rAAV viral particles for gene therapy. Efforts made to remove the helper viruses by CsCl density gradient centrifugation or filtration methods have produced little success so far, in particular these methods comprise steps which manifest themselves negatively as regards costs and yield.

Therefore, it is the object of the present invention to provide a product by which rAAV viral particles can be provided without contamination with helper viruses.

According to the invention this is achieved by the subject matters defined in the claims.

Thus, the subject matter of the present invention relates to an AAV DNA having helper virus sequences which are necessary for developing AAV viral particles.

The present invention is based on the applicant's finding that an AAV DNA according to the invention serves for inducing an rAAV vector commonly present in cells and containing a foreign DNA to develop rAAV viral particles without having to add helper viruses for this purpose.

The expression "AAV DNA" comprises any AAV DNA which may contain helper virus sequences necessary to develop AAV viral particles.

The expression "helper virus sequences" concerns any sequences of a helper virus necessary to develop AAV viral particles. Such sequences originate particularly from herpesviruses and/or adenoviruses, more particularly from adenovirus 5. The sequences may comprise the entire virus genome or fragments thereof.

The expression "rAAV vector" comprises any AAV viral particle and its DNA, which may contain a foreign DNA, except for that of a helper virus, which is necessary to develop AAV viral particles.

With the above exception, the expression "foreign DNA" relates to any DNA which can be incorporated in an AAV vector. The foreign DNA can be non-coding or coding. In the former case, it may be a control element of DNA replication and/or transcription. In the latter case, it is favorable for the foreign DNA to be expressible, it being particularly advantageous for the expression to be controlled by an inducible promoter such as a tissue-specific promoter. In addition, the foreign DNA may code for a diagnostic and/or

therapeutic protein. Examples of a therapeutic protein are tumor necrosis factor, plasma proteins and receptors. Moreover, the foreign DNA may be inserted at any site of the AAV vector.

An AAV DNA according to the invention can be prepared by common methods. By way of supplement, reference is made to Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook (Vols. 1-3), Cold Spring Harbour, New York, (1989). Furthermore, reference is made, in Example 1, to the preparation of the pTG9585 AAV DNA according to the invention. This AAV DNA comprises the complete adenovirus 5 sequence with the exception of the E1 region, as helper virus sequences. pTG9585 is preferred. It was deposited with the DSM [German-type collection of micro-organisms and cell cultures], Braunschweig, as plasmid pTG9585 under number DSM 11248 on October 18, 1996. Also, an AAV DNA according to the invention is preferred which differs from pTG 9585 in that it has a deletion in the structural gene L1 of the adenovirus 5 sequence, particularly in the region of nucleotides 16614-18669. This AAV DNA is referred to as pTG9585  $\Delta$  16614-18669.

A further subject matter of the present invention relates to a system comprising the above elements, i.e. an AAV DNA, an rAAV vector and optionally a cell. The AAV DNA and/or the cell represent a complementation as regards the AAV sequences of the rAAV vector. The expression "cell" concerns any cell, particularly mammalian cell, which permit the absorption and multiplication of AAV.

By means of the present invention it is possible to provide rAAV viral particle preparations without having to use helper viruses. Therefore, the rAAV viral particle preparations are also free from helper viruses.

They may also represent a subject matter of the present invention.

rAAV viral particle preparations according to the invention are perfectly suited for the transduction of cells. It may be favorable for the preparations to be treated with a DNase prior to their use, so that free AAV DNA is degraded. The cells in consideration are any cells which are present in a body or isolated from a body. Hence it is possible by the present invention to take measures for an *ex vivo* and *in vivo* gene therapy.

#### Explanation of the drawing

Fig. 1 shows the cloning strategy for obtaining the pTG9585 AAV DNA according to the invention

The invention is explained by the below examples.

#### **Example 1: Preparation of the AAV DNA pTG9585 according to the invention**

The cloning strategy for obtaining pTG9585 is shown in fig. 1. An MMTV LTR fragment from PUC8MMTV (Fasel et al., (1982), EMBO J. 1, pages 3-7) is inserted in the multiple cloning site of plasmid pBSSKII(+) (company of Stratagene). Then, 4235 pb of AAV2 sequence from pAV2 (Gene 23,65-73 (1983)) are inserted in this plasmid by means of a synthetic oligonucleotide adapter (AAV2 base pairs 263-4497),

which contain the complete rep gene and cap gene as well as the AAV2 promoters p19 and p40. Thus, the AAV2 promoter p5, which controls the expression of the Rep78 proteins and Rep68 proteins, respectively, is replaced in the resulting plasmid pBMA2 by the MMTV promoter. The complete expression cassette consisting of the MMTV-LTR and the AAV2 rep gene and cap gene is then inserted in the vector pAdRSV $\beta$ gal in the place of the RSV- $\beta$ gal fragment (J. Clin. Invest. 90, 625-630). The MMTV-AAV2 fragment is flanked in the thus resulting plasmid pAMA2 on both sides by adenoviral sequences (5': 0-1.0 map units; 3': 9.4-18 map units).

By means of homologous recombination (Chartier et al., J. Virol. 70, pp. 4805-4810 (1996)) the MMTV-AAV2 fragment from pAMA2 is inserted in the plasmid pTG3602 (cf. Chartier et al. above). Thus, the resulting plasmid pTG9585 contains the complete adenovirus 5 sequence, with the exception of the E1 region which is substituted by the MMTV-AAV2 fragment. pTG9585 represents an AAV DNA according to the invention.

**Example 2: Preparation of the pTG9585  $\Delta$  16614-18669 AAV DNA according to the invention**

A deletion of nucleotides 10983-18670 (the values relate to the adenovirus 5 sequence) is inserted in the AAV DNA pTG9585 prepared in Example 1 by restriction digestion using RsrII. Thereafter, a subfragment including nucleotides 10963-16613 is inserted in the deleted DNA molecule again. Thus, the deletion comprises a range of 2056 bp (nucleotides 16614-18669) from structural gene L1 of adenovirus 5. The pTG9585  $\Delta$  16614-18669 AAV DNA according to the invention is obtained.

**Claims**

1. AAV DNA having helper virus sequences which are necessary for developing AAV viral particles.
2. The AAV DNA according to claim 1, wherein the helper virus sequences originate from herpesvirus.
3. The AAV DNA according to claim 1, wherein the helper virus sequences originate from adenovirus.
4. The AAV DNA according to claim 3, wherein the adenovirus is adenovirus 5.
5. The AAV DNA according to claim 1, wherein the AAV DNA was deposited under DSM 11248 on October 18, 1996.
6. System comprising an AAV DNA according to claim 1, an rAAV vector and optionally a cell.
7. Use of the AAV DNA according to claim 1 and the system according to claim 6 for the production of an rAAV viral particle preparation which is not contaminated with helper viruses.



K 2357

**Abstract of the Disclosure**

**AAV DNA comprising helper virus sequences**

The present invention relates to an AAV DNA having helper virus sequences which are necessary for developing AAV viral particles, a system containing such a DNA and the use of both.

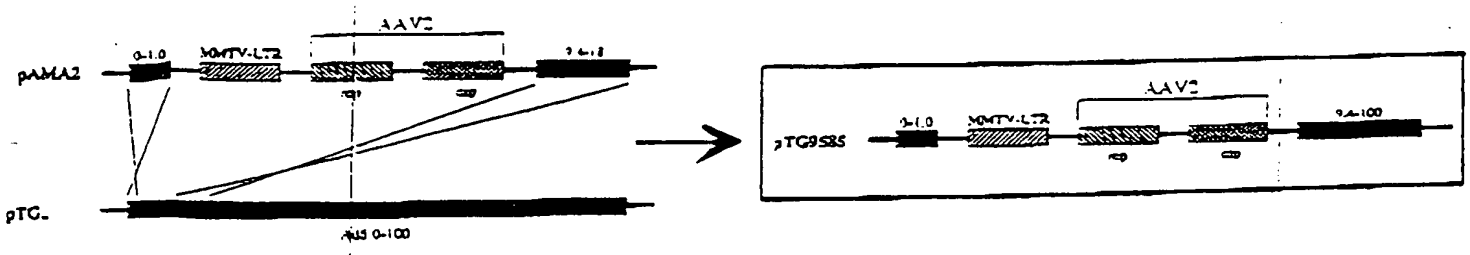
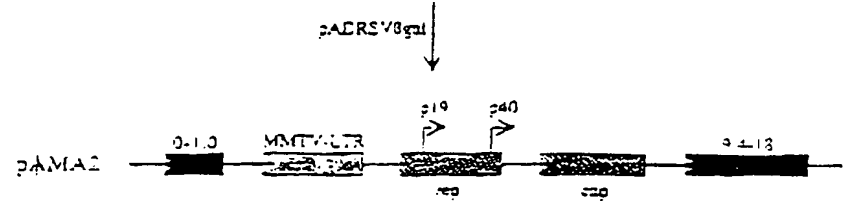
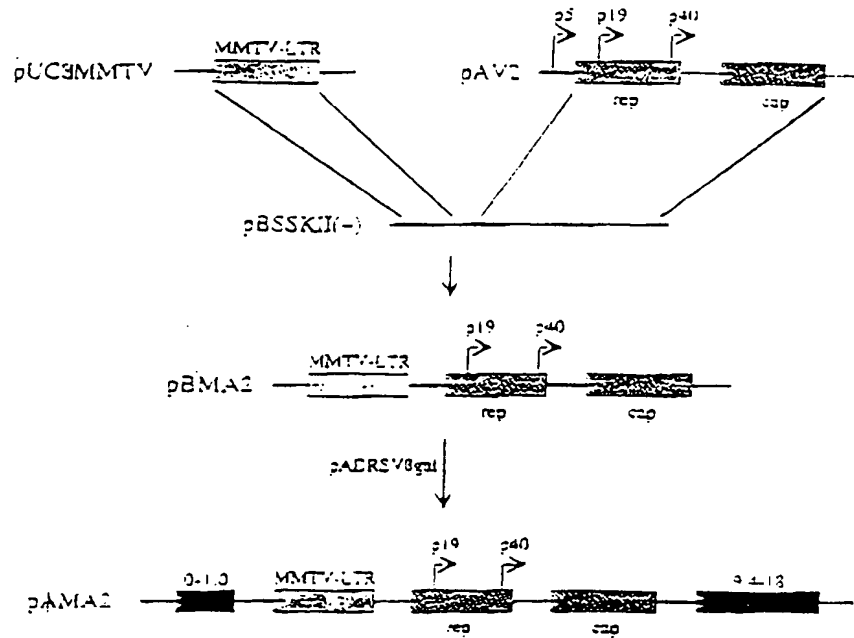


Fig. 1



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 196 44 500.0

**Anmeldetag:** 25. Oktober 1996

**Anmelder/Inhaber:** Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des öffentlichen Rechts, Heidel-  
berg, Neckar/DE; Transgene S.A.,  
Straßburg/Strasbourg/FR.

**Erstanmelder:** Deutsches Krebsforschungs-  
zentrum Stiftung des öffentlichen Rechts,  
Heidelberg, Neckar/DE

**Bezeichnung:** AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen

**IPC:** C 12 N, A 61 K, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 01. Februar 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Waasmaier

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum  
"AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen"  
Unser Zeichen: K 2357 - hu / wd

Die vorliegende Erfindung betrifft AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen, ein eine solche enthaltendes System und ihre Verwendung.

AAVs (Adeno-assoziierte Viren) sind einzelsträngige, zur Familie der Parvoviren gehörende DNA-Viren. Für ihre Replikation, d.h. zur Ausbildung von Viruspartikeln, benötigen AAVs Helferviren, insbesondere Adenoviren oder Herpesviren. In Abwesenheit von Helferviren können AAVs in das Wirtszellgenom, insbesondere an einer spezifischen Stelle von Chromosom 19, integrieren.

Das Genom von AAVs ist linear und weist eine Länge von ca. 4680 Nukleotiden auf. Es umfaßt zwei Leserahmen, die für ein strukturelles und ein nicht-strukturelles Gen kodieren. Das strukturelle Gen wird mit cap-Gen bezeichnet. Dieses steht unter der Kontrolle des P40-Promotors und kodiert für drei Capsid-Proteine. Das nicht-strukturelle Gen wird mit rep-Gen bezeichnet und kodiert für die Rep-Proteine, Rep 78, Rep 68, Rep 52 und Rep 40. Die beiden ersteren werden unter der Kontrolle des P5 Promotors exprimiert, während die Expression von Rep 52 und Rep 40 unter der Kontrolle des P19 Promotors steht. Die Funktionen der Rep-Proteine liegen u.a. in der Regulation der Replikation und Transkription des AAV-Genoms.

Es hat sich nun gezeigt, daß Präparationen von rekombinanten (r)AAV-Viruspartikeln häufig mit Helferviren, z.B. Adenoviren oder Herpesviren, kontaminiert sind. Diese Kontamination stellt eine erhebliche Limitierung der Verwendung von rAAV-Viruspartikeln für die Gentherapie dar. Bemühungen, die Helferviren durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation oder Filtrationsverfahren zu entfernen, waren bisher wenig erfolgreich, insbesondere umfassen diese Verfahren Schritte, die sich bei den Kosten und in der Ausbeute nachteilig bemerkbar machen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem rAAV-Viruspartikel ohne Kontamination mit Helferviren bereitge-

stellt werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen, die für die Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig sind.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß durch eine erfindungsgemäße AAV-DNA ein in Zellen gemeinsam vorliegender, eine Fremd-DNA enthaltender rAAV-Vektor zur Ausbildung von rAAV-Viruspartikeln veranlaßt wird, ohne daß hierfür Helferviren zugegeben werden müssen.

Der Ausdruck "AAV-DNA" umfaßt jegliche AAV-DNA, die Helfervirus-Sequenzen enthalten kann, welche für die Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig sind.

Der Ausdruck "Helfervirus-Sequenzen" betrifft jegliche Sequenzen eines Helfervirus, die zur Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig sind. Solche Sequenzen stammen insbesondere von Herpes- und/oder Adenoviren, ganz besonders von Adenovirus 5. Die Sequenzen können das gesamte Virus-Genom oder Fragmente davon umfassen.

Der Ausdruck "rAAV-Vektor" umfaßt jegliches AAV-Viruspartikel und dessen DNA, die eine Fremd-DNA, außer einer solchen eines Helfervirus, enthalten können, welche für die Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig ist.

Der Ausdruck "Fremd-DNA" betrifft mit vorstehender Ausnahme jegliche DNA, die in einem AAV-Vektor integriert sein kann. Die Fremd-DNA kann nicht-kodierend oder kodierend sein. In ersterem Fall kann sie ein Regulator-Element der DNA-Replikation und/oder Transkription sein. In letzterem Fall ist es günstig, wenn die Fremd-DNA exprimierbar ist, wobei es besonders vorteilhaft ist, wenn

die Expression unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors, wie eines gewebespezifischen Promotors, steht. Ferner kann die Fremd-DNA für ein diagnostisches und/oder therapeutisches Protein kodieren. Beispiele eines therapeutischen Proteins sind Tumornekrosefaktor, Plasmaproteine und Rezeptoren. Desweiteren kann die Fremd-DNA an beliebiger Stelle des AAV-Vektors inseriert sein.

Eine erfindungsgemäße AAV-DNA kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Ergänzend wird auf Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook (Band 1-3), Cold Spring Harbour, New York, (1989) verwiesen. Ferner wird auf die Herstellung der erfindungsgemäßen AAV-DNA pTG 9585 in Beispiel 1 verwiesen. Diese AAV-DNA umfaßt als Helfervirussequenzen die vollständige Adenovirus 5-Sequenz mit Ausnahme der E1-Region. pTG 9585 ist bevorzugt. Sie wurde bei der DSM, Braunschweig, als Plasmid pTG9585 unter der Nummer DSM 11248 am 18. Okt. 1996 hinterlegt. Weiterhin ist eine erfindungsgemäße AAV-DNA bevorzugt, die sich von pTG 9585 darin unterscheidet, daß sie eine Deletion im Strukturgen L1 der Adenovirus 5-Sequenz, insbesondere im Bereich der Nukleotide 16614-18669, aufweist. Diese AAV-DNA wird mit pTG 9585  $\Delta$  16614-18669 bezeichnet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein System aus vorstehenden Elementen, d.h. einer AAV-DNA, einem rAAV-Vektor und gegebenenfalls einer Zelle. Die AAV-DNA und/oder die Zelle stellen hinsichtlich der AAV-Sequenzen des rAAV-Vektors eine Komplementation dar. Der Ausdruck "Zelle" betrifft jegliche Zelle, insbesondere Säugetierzelle, welche die Aufnahme und Vermehrung von AAV erlauben.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, rAAV-Viruspartikel-Präparationen bereitzustellen, ohne daß Helferviren verwendet werden müssen. Die rAAV-Viruspartikel-Präparationen sind somit auch Helfervirus frei. Sie stellen ebenfalls einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar.

Erfindungsgemäße rAAV-Viruspartikel-Präparationen eignen sich bestens zur Transduktion von Zellen. Günstig kann es sein, wenn die Präparationen vor ihrer Verwendung mit einer DNase behandelt werden, wodurch freie AAV-DNA abgebaut wird. Als Zellen kommen jegliche Zellen in Frage, die im oder isoliert aus einem Körper vorliegen. Mit der vorliegenden Erfindung ist es somit möglich, Maßnahmen für eine ex vivo und in vivo Gentherapie zu ergreifen.

#### Erläuterung der Zeichnung

Fig. 1 zeigt die Klonierungsstrategie zum Erhalt der erfindungsgemäßen AAV-DNA pTG9585

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

#### **Beispiel 1 : Herstellung der erfindungsgemäßen AAV-DNA pTG9585**

Die Klonierungsstrategie zum Erhalt von pTG9585 ist in Fig. 1 gezeigt. Es wird ein MMTV-LTR-Fragment aus PUC8MMTV (Fasel et al., (1982), EMBO J. 1, S. 3-7) in die multiple Klonierungsstelle des Plasmids pBSSKII(+) (Fa. Stratagene) eingefügt. In dieses Plasmid werden dann mit Hilfe eines synthetischen Oligonukleotidadaptors 4235 bp AAV2-Sequenz aus pAV2 (Gene 23,65-73 (1983)) inseriert (AAV2-Basenpaare 263-4497), welche das vollständige rep- und cap-Gen sowie die AAV2-Promotoren p19 und p40 enthalten. Im resultierenden Plasmid pBMA2 ist somit der AAV2-Promotor p5, der die Expression der Rep78 bzw. Rep68-Proteine steuert, durch den MMTV-Promotor ersetzt. Die komplette Expressionskassette bestehend aus dem MMTV-LTR und dem AAV2 rep- und cap-Gen, wird dann an die Stelle des RSV- $\beta$ gal-Fragments in den Vektor pAdRSV $\beta$ gal (J. Clin. Invest. 90, 625-630) eingefügt. Im so entstandenen Plasmid pAMA2 wird das MMTV-AAV2-Fragment beiderseitig von adenoviralen Sequenzen (5': 0-1,0 map units; 3': 9,4-18 map units) flankiert.

Mittels homologer Rekombination (Chartier et al., J. Virol. 70, S. 4805-4810 (1996)) wird das MMTV-AAV2-Fragment aus pAMA2 in das Plasmid pTG3602 (vgl. Chartier et al. vorstehend) eingefügt. Das resultierende Plasmid pTG9585 enthält somit die vollständige Adenovirus 5-Sequenz mit Ausnahme der E1-Region, die durch das MMTV-AAV2-Fragment substituiert ist. pTG9585 stellt eine erfindungsgemäße AAV-DNA dar.

**Beispiel 2: Herstellung der erfindungsgemäßen AAV-DNA pTG9585  $\Delta$  16614-18669**

In die in Beispiel 1 hergestellte AAV-DNA pTG9585 wird durch Restriktionsverdau mit RsrII eine Deletion der Nukleotide 10983-18670 (die Zahlen beziehen sich auf die Adenovirus 5-Sequenz) eingeführt. Danach wird ein Subfragment mit den Nukleotiden 10963-16613 wieder in das deletierte DNA-Molekül eingesetzt. Die Deletion umfaßt somit einen Bereich von 2056 bp (Nukleotide 16614-18669) aus dem Strukturgen L1 von Adenovirus 5. Es wird die erfindungsgemäße AAV-DNA pTG9585  $\Delta$  16614-18669 erhalten.



K 2357

**Patentansprüche**

1. AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen, die für die Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig sind.
2. AAV-DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Helfervirus-Sequenzen von Herpesvirus stammen.
3. AAV-DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Helfervirus-Sequenzen von Adenovirus stammen.
4. AAV-DNA nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Adenovirus Adenovirus 5 ist.
5. AAV-DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die AAV-DNA unter DSM 11248 am 18. Okt. 1996 hinterlegt worden ist.
6. System, umfassend eine AAV-DNA nach Anspruch 1, einen rAAV-Vektor und gegebenenfalls eine Zelle.
7. Verwendung der AAV-DNA nach Anspruch 1 und des Systems nach Anspruch 6 zur Herstellung einer rAAV-Viruspartikel-Präparation, die nicht mit Helferviren kontaminiert ist.

K 2357

## **Zusammenfassung**

### **AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen, die für die Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig sind, ein eine solche DNA enthaltendes System sowie die Verwendung beider.

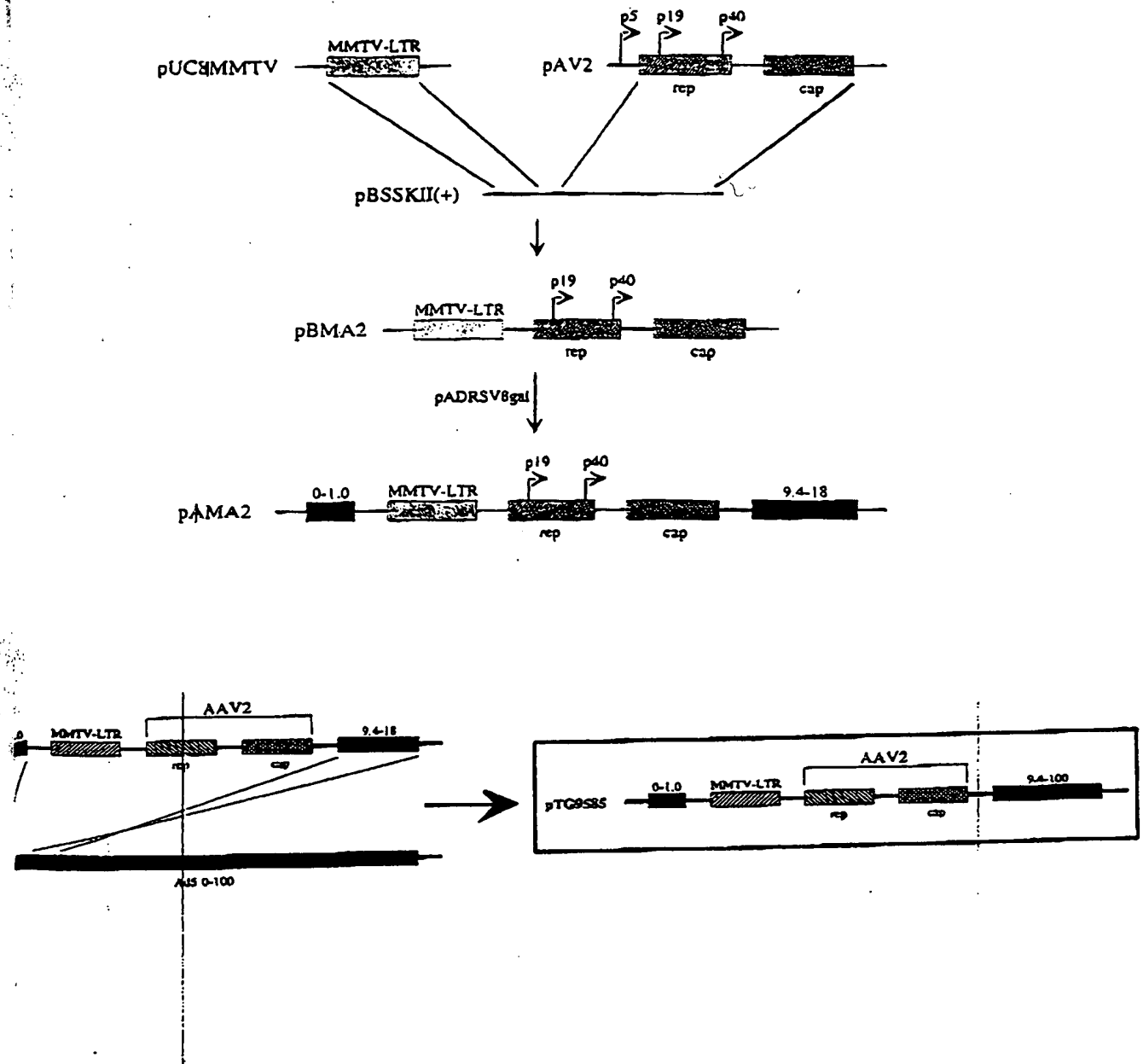


Fig. 1